

E. Kauer

1962

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN GEHALT VON MIKROORGANISMEN
AN DESOXYRIBONUKLEINSÄURE (DNS) IN VERBINDUNG
MIT DEM RESISTENZPROBLEM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

EBERHARD KAUER

aus Dresden



1962

Dekan: Professor Dr. H. Bredt
Referent: Professor Dr.Dr. G. GILLISSEN
Korreferent: Prof. Dr. H. Kliewe
Tag der mündl. Prüfung: 13.11.1962

INHALT

- 1) Einleitung und Ziel der Arbeit
- 2) Der Typ des Resistenzanstiegs bei einer in vitro-"Anzüchtung" der Resistenz gegen Penicillin und Streptomycin
- 3) Begleiterscheinungen der Penicillin- und Streptomycin-Resistenz

EIGENE VERSUCHE

- 4) Versuchsanordnung
- 5) Besprechung der Ergebnisse
- 6) Diskussion
- 7) Zusammenfassung
- 8) Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1) Einleitung und Ziel der Arbeit

SMOLENS und VOGT (1953) zeigten, daß der Gehalt der Nährböden an Nukleinsäuren einen Einfluß hat auf die Chemoresistenz von Mikroorganismen. Ferner ist bekannt, daß die Resistenzentstehung aufzufassen ist als eine Mutation, die mit einer bestimmten Rate spontan entsteht, oder bei der Entstehung resistenter Populationen durch eine Selektion. Mutationen können spontan entstehen, ohne daß chemisch zunächst eine genaue Definition der dazu erforderlichen Schritte möglich ist oder künstlich durch Beeinflussung lebender Zellen mit isolierter DNS aus Zellen der gleichen Art, die sich aber von der zu induzierenden Zelle durch eine oder durch mehrere Charakteristika unterscheidet.

Da ferner durch die Arbeiten von VENDRELY und VENDRELY (1949), von BASS und DUNN (1957) bekannt ist, daß eine direkte Beziehung besteht zwischen Chromosomenzahl und DNS-Gehalt der Zelle, lag die Frage nahe, ob unterschiedliche Resistenzgrade von ein und demselben Bakterienstamm einem unterschiedlichen Gehalt an DNS entsprechen. Diese Frage ist auch insofern von Interesse, als gezeigt werden konnte, daß mit kristalliner DNase die relative Zahl penicillinresistenter Klone einer Staphylokokkenpopulation vermindert wird (GILLISSEN 1959).

Diese Fragestellung wurde scheinbar auch in einer Arbeit von BUKRINSKAJA angeschnitten, in der der Gehalt von Coli-Bakterien an Proteinen, an DNS und an Ribonukleinsäure (RNS) zum Resistenzgrad gegen Penicillin, Streptomycin und Synamycin in Beziehung gesetzt wurde.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen ist es, unter statistischen Gesichtspunkten festzustellen, ob sich der DNS-Gehalt von Staphylokokken in Abhängigkeit von der Penicillin-Resistenz und der von Coli-Bakterien in Abhängigkeit von der Streptomycin-Resistenz ändert. Im Hinblick auf die stets sehr große Streubreite mikroskopischer und kultureller Keimzählungen wurde als Bezugsgröße der Gesamtstickstoff der Testkeime gewählt.

2) Der Typ des Resistenzanstiegs bei einer in vitro- "Anzüchtung" der Resistenz gegen Penicillin und Streptomycin

Klinische Beobachtungen und in vitro-Versuche führten zu dem Eindruck einer unterschiedlich schnellen Resistenzzunahme je nach Art des Mikroorganismus und nach Art des Wirkstoffes. Deswegen war es von Interesse festzustellen, ob die Schnelligkeit des Resistenzanstiegs als ein sekundäres Resistenzcharakteristikum einzelner Stämme anzusehen ist.

Impft man einen Teststamm sukzessive in Medien mit progressiv steigenden Wirkstoffkonzentrationen, dann benötigt man für verschiedene Stämme bei Verwendung des gleichen Antibiotikums verschieden viele Passagen zur Erreichung eines bestimmten Resistenzgrades. MURRAY und Mitarb. benötigten bis zur Erreichung einer maximalen Streptomycinresistenz von 5×10^4 E/ml bei Verwendung von *A. aerogenes* 27 Passagen und bei *Kl. pneumoniae* 44 Passagen. WRIGHT und Mitarb. (1953) benötigten bei verschiedenen Stämmen von Enterokokken und Erythromycin als Wirkstoff 25 Passagen, um einmal eine 125fache und ein andermal eine 1000fache Resistenzsteigerung gegenüber dem Ausgangsstamm zu erreichen. Demgegenüber erhielten HAIGHT und Mitarb. (1952) mit nur 9 Passagen bei einem Enterokokkenstamm eine 4000fache Steigerung der Erythromycinresistenz. Ähnliche Unterschiede wurden auch mit anderen Bakterienstämmen und anderen Wirkstoffen beobachtet.

Man gewinnt danach den Eindruck, daß die für eine bestimmte mittlere Populationsresistenz erforderliche Passagenzahl recht unterschiedlich sein kann. Natürlich muß bei der Beurteilung dieser Ergebnisse berücksichtigt werden, daß die hier angewandte Methode recht grob und mit großen Fehlern behaftet ist. Genauere Aussagen lassen sich dagegen erhalten durch die Bestimmung der unter definierten Bedingungen für einen jeden Stamm eigentümlichen Mutationsrate. Während die Mutationsrate des Parentalstammes einer der wesentlichsten Faktoren für die Resistenzsteigerung einer Population sein kann, ist die Wachstumsrate, d.h. die Generationszeit, häufig von Bedeutung für die Reduzierung der mittleren Chemoresistenz der Gesamtpopulation.

Näher definiert wurde die Art des Resistenzanstiegs einer Population vor allem durch BRYSON und SZYBALSKI. Methodisch wurde dazu die sehr viel bessere Methode der Aufstellung von Überlebenskurven benutzt, wobei auch die graduelle Resistenzverteilung berücksichtigt wurde. Eine Überlebenskurve erhält man durch Eintragung der Proportion resistenzbildender Zellen auf

die Ordinate gegen die Wirkstoffkonzentration auf der Abszisse. Die Überlebenskurven entstehen, je nachdem, wieviel Schritte - ausgehend vom jeweils überlebenden Anteil der Population - erforderlich sind, um eine hohe Resistenz zu erreichen. Die Art der Überlebenskurven bzw. die Art dieses Musters ist charakteristisch für einen Wirkstoff oder für Wirkstoffgruppen (BRYSON und DEMEREC, 1950).

Man kann drei Grundtypen unterscheiden:
das Vielschrittmuster,
das fakultative Einschrittmuster und
das obligate Einschrittmuster
(DEMEREC 1948).

Beim Vielschrittmuster sind also viele Schritte erforderlich, um von einem aus einer Population ermittelten resistenten Stamm weitere Stämme mit immer höheren mittleren Resistenzgraden zu erhalten. Typische Beispiele dafür sind der Resistenzanstieg von *Staph. aureus* gegenüber Penicillin oder von *M. ranae* gegen Neomycin. Gewisse Abweichungen dieses Vielschrittmusters bei Verwendung anderer Keime und anderer Wirkstoffe brauchen hier nicht weiter diskutiert zu werden. Einschränkung ist zu sagen, daß mit dieser Methode Überlebenskurven von Penicillinasebildnern nicht möglich sind (SZYBALSKI 1953).

Beim obligaten Einschrittmuster besitzen die überlebenden Zellen der Erstkultur praktisch schon die Resistenz des letztlich resultierenden resistentesten Stammes. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Resistenzanstieg von *E. coli* gegen Phagen. Eine Abart dieses Musters liegt vor bei dem sog. fakultativen Einschrittmuster, bei dem der Resistenzanstieg ausgehend von der Erstkultur in einem oder in mehreren Schritten erfolgen kann, wie es meist bei der Entwicklung der Streptomycin-Resistenz von *E. coli* beobachtet wird. Grundsätzlich ist aber zu dieser Art der Einteilung zu sagen, daß natürlich stets Ausnahmen möglich sind (BRAYSON und DEMEREC 1950).

3) Begleiterscheinungen der Penicillin- und Streptomycinresistenz

Begleiterscheinungen der Penicillin- und Streptomycin-Resistenz sind von großem Interesse, weil sie der Resistenz eine Spezifität verleihen können.

Man dachte zunächst an den Grad der erreichbaren mittleren Resistenz einer

Population. Untersuchungen in dieser Richtung weisen darauf hin, daß dieses Charakteristikum sowohl von der Keimart als auch von dem Wirkstoff abhängen dürfte. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das der β -haemolysierenden A.-Streptokokken, die praktisch gegen Penicillin nicht resistent werden, gegen Streptomycin aber unter Umständen sehr hohe Resistenzgrade erreichen. Die Bedeutung des Wirkstoffes ist in einem extremen Fall dagegen am Beispiel des Tyrothrycin erkenntlich. Gegen diesen Wirkstoff gibt es - zumindest klinisch - keine Resistenz, was im wesentlichen auf die eiweißfällende Wirkung dieser Substanz zurückgeführt werden kann. Stoffe, die zu den sog. Bakteriostatika gehören, führen dagegen leichter zu einer Resistenzsteigerung. Generell kann gesagt werden, daß der erreichbare Resistenzgrad nur bedingt als eine sekundäre Eigenschaft der Resistenz angesehen werden kann.

Wesentlicher sind Mehrfachresistenzen als mögliche Attribute der Chemoresistenz. SZYBALSKI und BRYSON unterschieden 1952 zwei Möglichkeiten, nämlich eine sog. reziproke Kreuzresistenz, wobei die Resistenz gegen den einen Stoff zwangsläufig die Resistenz gegen einen weiteren Stoff einschließt und ferner eine sog. nichtreziproke Resistenz, bei der die Resistenz gegen eine Substanz wohl eine Resistenz gegen eine weitere hervorruft, aber nicht umgekehrt. Aber auch hier sind verallgemeinernde Aussagen nur schwer zu machen, da man zwar gemeinhin bei chemisch verwandten Stoffen eine reziproke Kreuzresistenz findet, die aber andererseits in vielen Fällen fehlen kann.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß manche Keimpopulationen mit einer Resistnzerhöhung gegen einen Wirkstoff gleichzeitig eine Sensibilitätszunahme gegen andere Wirkstoffe erwerben, weshalb SZYBALSKI (1953) den Begriff der Kollateralsensibilität einführte.

Gelegentlich können auch morphologische Änderungen der Zellen von Mikroorganismen und von Bakterienkolonien mit Resistenzerscheinungen korrelieren. Solche Beobachtungen wurden in Verbindung mit der Chemoresistenz besonders bei Protozoen schon sehr früh gemacht (Übersicht s. SCHNITZER, 1932). Bei dieser Frage ist natürlich zu unterscheiden, ob solche morphologische Änderungen nur während der Einwirkung des chemischen Agens zustandekommen, oder ob resistente Zellen auch in Abwesenheit der Droge diese Änderungen beibehalten (I. HIRSCH, 1945, u. a.). Bekannt ist die häufig gesehene Größenzunahme von Staphylokokken durch die Zunahme der Resistenz gegen Sulfonamide und Penicillin bei Staphylokokken (BLAIR, 1946, HUNTER u. Mitarb., 1950, u. a.). An morphologischen Änderungen der Zell- und Koloniform sind ferner zu nennen: Änderung in der Gramfärbung, Größe der Kolo-

nien, Änderungen in der Pigmentierung (RAKE und Mitarb. 1944, MAYER-HARTING, 1955, u.a.).

Änderungen der Virulenz in Verbindung mit der Chemoresistenz wurden beschrieben vor allem bei streptomycinresistenten Tuberkel-Bakterien (MEISSNER, 1953). Ähnliche Beobachtungen wurden aber auch gemacht bei Coryne-Bakterien (WILDE, 1958) und bei verschiedenen anderen Bakterienarten. Bei einer größeren Anzahl von Staph. aureus-Stämmen aus pathologischem Material wurde bei einem korrelationsstatistischen Vergleich festgestellt, daß bei zunehmendem Resistenzgrad gegen Penicillin auch die Penicillinase-Aktivität zunahm, während der α -Haemolysintiter abnahm. Der Plasmakoagulasetiter stand dagegen in keinem statistisch beweisenden Abhängigkeitsverhältnis zum Resistenzgrad (GILLISSEN und SCHILLING, 1959). Differenziert man Pathogenität und Virulenz, dann wird die Pathogenität von Staph. aureus in Abhängigkeit von der Plasmakoagulasebildung und die Virulenz von der α -Haemolysinbildung gesehen, so daß die obenerwähnten Resultate den Schluß ermitteln, daß - wenigstens bei Stämmen aus pathologischem Material - sich mit zunehmendem Resistenzgrad die Infektiosität nicht verändert, während die Virulenz abnimmt.

Zu erwähnen ist ferner die korrelationsstatistisch gesicherte Beziehung zwischen einem zunehmenden Resistenzgrad gegen Penicillin und zunehmender Phosphatase-Aktivität (GILLISSEN und RUDA, 1958).

Versuche über die Verwertung von Kohlehydraten durch Keime, die gegen verschiedene Wirkstoffe resistent waren, ergaben im Verhältnis zum chemosensiblen Ausgangsstamm bei den verschiedenen Autoren keine einheitlichen Resultate.

Streptomycinresistente Mutanten scheinen unfähig zu sein, Hämin zu synthetisieren, können aber reduziertes Hämin oder Protoporphyrin zur Bildung bestimmter Dehydrogenasen verwenden.

4) Versuchsanordnung

Als Teststämme dienten Stämme von *M. pyogenes* var. aureus mit einer verschieden hohen mittleren Penicillin-Resistenz. Der Resistenzgrad wurde bei gleichen Einsaatmengen im Dilutionstest mit geometrischen Verdünnungsstufen ermittelt. Bei allen Stämmen handelt es sich um solche, deren Resistenz in vitro - "angezüchtet" worden war, indem die Testkeime sukzessive in Nährmedien mit progredient ansteigenden Wirkstoffkonzentrationen gezücht-

tet wurden. Ausgangsstamm war der Staph. aureus-Stamm SG 511, der unter den gleichen Testbedingungen eine mittlere Sensibilität von 0,04 E Pc/ml hatte. Damit kann also mit Sicherheit gesagt werden, daß es sich bei den resistenten Varianten um Nicht-Penicillinasebildner handelt, im Gegensatz zu den resistenten Varianten, die man aus pathologischem Material isoliert. Die Staphylokokken-Stämme wurden nur auf Penicillin-Resistenz untersucht.

In gleicher Weise wurde ein aus dem Untersuchungsmaterial isolierter Stamm von E. coli behandelt unter Verwendung von Streptomycinsulfat als Wirkstoff. Ausgehend von dem frisch isolierten Stamm mit einer mittleren Sensibilität gegen Streptomycin von 0,8 µg/ml wurden verschieden hohe streptomycinresistente Varianten gewonnen. Alle Stämme wurden zunächst auf Schrägagar gehalten und bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Kurz vor Versuchsbeginn wurden alle Stämme noch einmal auf ihre Resistenz geprüft, indem von der Schrägagarkultur zunächst eine Bouillonkultur angelegt wurde, die nach einer Bebrütungszeit von 16 - 18 Stunden und Vorverdünnung von 10^{-2} gegen den entsprechenden Wirkstoff ausgetestet wurden, d.h. also die Staphylokokken gegen Penicillin und die Coli-Bakterien gegen Streptomycin.

Die Bestimmung der DNS erfolgte mit der von RACKER angegebenen dichromatischen spektrophotometrischen Methode in der von GLASS und NOVICK verwandten Anordnung. Der DNS-Gehalt der Keime wurde bezogen auf den Gesamtstickstoffgehalt der Zellen, da eine Beziehung auf die einzelne Zelle eine Zellzählung erfordert hätte. Solche Keimzählbestimmungen sind entweder durchzuführen mit Zählkammern unter dem Mikroskop nach entsprechender Vorverdünnung und Anfärbung oder aber durch Ausstreichen geeigneter Vorverdünnungen auf feste Nährböden und Auszählung der gewachsenen Kolonien. Im letzten Falle spricht man häufig auch von einer sog. Lebendkeimzahlbestimmung. Alle diese Verfahren haben eine erhebliche Fehlerbreite, die zwar statistisch faßbar ist, selten aber unter $\pm 10\%$ zu liegen kommt. Abgesehen davon ist der erforderliche Aufwand erheblich. Zu bedenken ist auch, daß besonders Staphylokokken selten isoliert liegen oder wegen der Klonbildung eine auf einem festen Nährboden gewachsene Kolonie nicht unbedingt gleichgesetzt werden kann mit einer einzelnen Zelle. Aus diesen verschiedenen Gründen erschien es ratsam, den DNS-Gehalt auf den Gesamtstickstoff einer Zellsuspension zu beziehen.

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach feuchter Veraschung unter Zugabe von Selenreaktionsgemisch mit der Kjeldahl-Methode.

Die Versuche wurden im einzelnen folgendermaßen durchgeführt: Agarplat-

ten wurden mit einer 16 Stunden alten Bouillonkultur der Teststämme verschiedener Resistenz beimpft und nach 16 Stunden langer Bebrütung bei 37° C mit Aqua dest. abgeschwemmt. Nach Waschen wurden die Zellen mit Aqua bidest. aufgenommen und durch Schütteln fein suspendiert, um den Pipettierfehler möglichst zu reduzieren.

Von aliquoten Anteilen dieser Keimsuspension wurde stets in doppeltem Ansatz der Gesamtstickstoff und der DNS-Gehalt unter Benutzung einer vorher mit einer käuflichen DNS aufgestellten Eichkurve bestimmt. Bei der angegebenen Methode der DNS-Bestimmung werden Keime, also nicht schon vorher isolierte Nukleinsäuren, benutzt. Daher bleiben bei der DNS-Bestimmung nach dem Kochen mit Diphenylaminreagens noch geringe Trübungen zurück, die beim Photometrieren stören. Deswegen wurden die mit Diphenylaminreagens behandelten Proben vor dem Photometrieren zur Klärung der Lösung 10' lang hochtourig (12 000 U/min.) in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Diese Maßnahme erschien statthaft, da Vergleichsversuche mit gereinigter DNS ergaben, daß eine solche Behandlung keine Veränderung der entwickelten Farbintensität verursacht.

Da die bei der DNS-Bestimmung zustandegekommene Blaufärbung häufig so intensiv war, daß der Photometerwert nicht mehr in den optimalen Abiesebereich fiel, wurde die zu testende Keimsuspension vor der Behandlung mit dem Diphenylreagens 1 : 8 mit Aqua dest. vorverdünnt und die mittels Eichkurve erhaltene DNS-Konzentration pro ml unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die DNS-Konzentration der Ausgangssuspension umgerechnet (μg DNS/ml). Bei jeder DNS-Bestimmung wurden 6 Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert genommen. Zur Gesamtstickstoffbestimmung wurden meist 3 ml der Keimsuspension benutzt, wobei der ermittelte Gesamtstickstoffgehalt auf die in 1 ml enthaltene Menge umgerechnet wurde ($\text{mg N}_2/\text{ml}$). Da sowohl die DNS-Werte als auch die Stickstoffwerte auf dieselbe Volumeneinheit bezogen wurden, konnte die Relation DNS/Gesamtstickstoff aufgestellt werden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Gegenüberstellung der Gewichtsrelationen DNS/Gesamtstickstoff auf der Ordinate gegen den Resistenzgrad der Teststämme auf logarithmische Abszisse ($\log. (\text{Resistenz} \cdot 100)$). Danach wurde die Beziehung zwischen den Wertangaben mit der Regressionsrechnung und der Varianzanalyse statistisch verglichen.

5) Besprechung der Ergebnisse

In Tab. 1) sind die Ergebnisse mit verschiedenen penicillinresistenten Staphylokokken-Stämmen wiedergegeben.

Tabelle 1)

Versuche mit verschiedenen penicillinresistenten Staphylokokken-Stämmen

Stamm-Nr.	mittl. Pc. - Sensib. i. E. Pc/ml	log. (100 · Res.)	N ₂ in mg/ml	DNS g/ml	DNS/N ₂
1	0,125	1,0969	1,176 + 0,7%	148	125
2	0,25	1,3979	1,036 + 0,7%	380	366
3	0,5	1,6990	0,924 + 0,78%	311	337
4	0,5	1,6990	1,120 + 0,6%	476	425
5	0,5	1,6990	0,966 + 0,7%	303	313
6	0,5	1,6990	0,672 + 1,1%	326	484
7	1,0	2,0000	0,196 + 3,7%	592	3015
8	1,0	2,0000	0,392 + 1,8%	950	2422
9	1,5	2,1761	0,238 + 3,0%	618	2597
10	1,5	2,1761	0,140 + 5,2%	804	5742
11	2,0	2,3010	0,196 + 3,7%	1350	6886
12	2,0	2,3010	0,224 + 3,2%	902	4025
13	2,0	2,3010	0,322 + 2,3%	738	2210
14	3,0	2,4771	0,154 + 4,7%	1178	7646
15	3,0	2,4771	0,322 + 2,26%	1128	3503
16	3,0	2,4771	0,308 + 2,4%	778	2525
17	4,0	2,6020	0,154 + 4,7%	1392	9038
18	4,0	2,6021	0,224 + 3,25%	850	3801
19	6,0	2,7782	0,280 + 2,6%	1296	4629
20	8,0	2,9031	0,168 + 4,3%	1422	8456
21	8,0	2,9031	0,294 + 2,5%	418	1420
22	8,0	2,9031	0,168 + 4,3%	804	4786
23	10,0	3,0000	0,238 + 3,0%	474	1990
24	12	3,0792	0,280 + 2,6%	292	1042
25	16	3,2041	0,252 + 2,8%	954	3784
26	16	3,2041	0,280 + 2,6%	302	1077
27	16	3,2041	0,172 + 4,2%	628	3651
28	24	3,3802	0,126 + 5,8%	1022	8108

Fortsetzung der Tabelle 1)

Stamm-Nr.	mittl. Pc. - Sensib. i. E. Pc/ml	log. (100 · Res.)	N ₂ in mg/ml	DNS g/ml	DNS/N ₂
29	24	3,3802	0,159 $\pm$ 4,5%	574	3670
30	31	3,4914	0,182 $\pm$ 4%	1130	6606
31	62	3,7924	0,167 $\pm$ 4,3%	796	4766
32	62	3,7924	0,154 $\pm$ 4,7%	750	4867
33	94	3,9731	0,144 $\pm$ 5,0%	466	3233
34	94	3,9731	0,143 $\pm$ 4,9%	814	5460
35	125	4,0969	0,140 $\pm$ 5,2%	560	4000

Die in Tab.1) wiedergegebenen Werte wurden in Abb.1) zusammengestellt.

Aus Abb.1) ist ersichtlich, daß der DNS-Gehalt bezogen auf den Gesamtstickstoff mit steigender Penicillin-Resistenz zunimmt. Die statistische Berechnung der Regression ergibt mit $x = \log. (\text{mittl. Sensibilität} \cdot 100)$ und $y = \text{DNS/Gesamtstickstoff bei } n = 35$ für $S_x^2 = 20,7$, für $S_y^2 = 210,74 \cdot 10^6$ und für $S_{xy} = 30730$ ein $b = 1484$. Diese Zunahme von DNS/Gesamtstickstoff mit zunehmendem Resistenzgrad ist mit $s_b = 491,6$ und $t = 3,0192$ bei $P = < 0,01$ ($> 0,001$) mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% für die Reproduzierbarkeit beweisend.

In Tab.2) sind die entsprechenden Ergebnisse mit verschiedenen streptomycin-resistenten E.coli-Stämmen wiedergegeben.

Tabelle 2)

Versuche mit verschiedenen streptomycinresistenten E. coli- Stämmen

Stamm- Nr.	mittl. Strept. Sensib. i. μg Strept./ml	log. (100 · Res.)	N ₂ in mg/ml	DNS g/ml	DNS/N ₂
1	1,95	2,2900	0,159 $\pm$ 4,6%	622	3909
2	2,5	2,3979	0,163 $\pm$ 4,5%	448	2748
3	6,25	2,7959	0,172 $\pm$ 4,2%	554	3218
4	12,5	3,0969	0,146 $\pm$ 4,9%	602	4120
5	12,5	3,0969	0,476 $\pm$ 4,6%	660	1386
6	25	3,3979	0,163 $\pm$ 4,5%	452	2773
7	50	3,6990	0,145 $\pm$ 5,0%	588	4055
8	50	3,6990	0,154 $\pm$ 4,7%	412	2675
9	62,5	3,7959	0,140 $\pm$ 5,2%	401	2862
10	125	4,0969	0,146 $\pm$ 4,9%	448	3068
11	125	4,0969	0,135 $\pm$ 5,4%	76	562
12	250	4,3979	0,167 $\pm$ 4,3%	68,8	411
13	250	4,3979	0,149 $\pm$ 4,9%	63	424
14	250	4,3979	0,163 $\pm$ 4,5%	140	858
15	312	4,4942	0,140 $\pm$ 5,2%	28	200
16	312	4,4942	0,121 $\pm$ 6,0%	68,8	568
17	312	4,4942	0,144 $\pm$ 5,0%	118	817
18	312	4,4942	0,144 $\pm$ 5,0%	556	3861
19	375	4,5740	0,159 $\pm$ 4,6%	198	1247
20	470	4,6721	0,121 $\pm$ 6,0%	71	588
21	500	4,6990	0,081 $\pm$ 8,9%	82	1017
22	625	4,7959	0,117 $\pm$ 6,2%	69	588
23	625	4,7959	0,126 $\pm$ 5,8%	54	425
24	625	4,7959	0,159 $\pm$ 4,6%	282	1771
25	625	4,7959	0,126 $\pm$ 5,8%	468	3714
26	950	4,9777	0,135 $\pm$ 5,4%	528	3911
27	1250	5,0969	0,121 $\pm$ 6,0%	230	1897
28	1850	5,2672	0,131 $\pm$ 5,5%	598	4588
29	2500	5,3979	0,135 $\pm$ 5,4%	304	2252

Die in Tab. 2) wiedergegebenen Werte sind in Abb. 2) graphisch dargestellt.

Tabelle 1

Staph. aureus/Penicillin

DMS/N₂

8000

7000

6000

5000

4000

3000

2000

1000

1.0

1.5

2.0

2.5

3.0

3.5

4.0

log. (Resist. x 100)

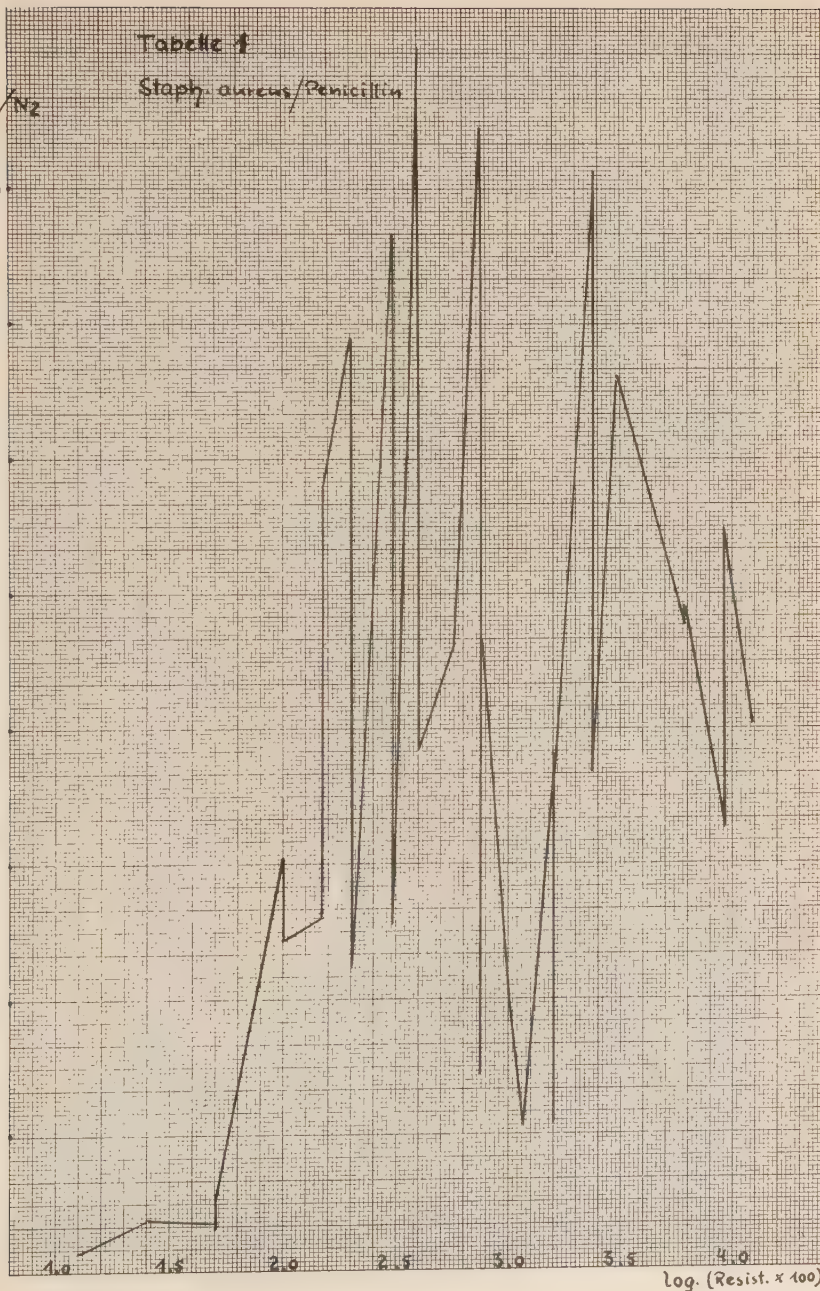


Tabelle 2

E. coli / Streptomycin

DNS / N_2

5000

4000

3000

2000

1000

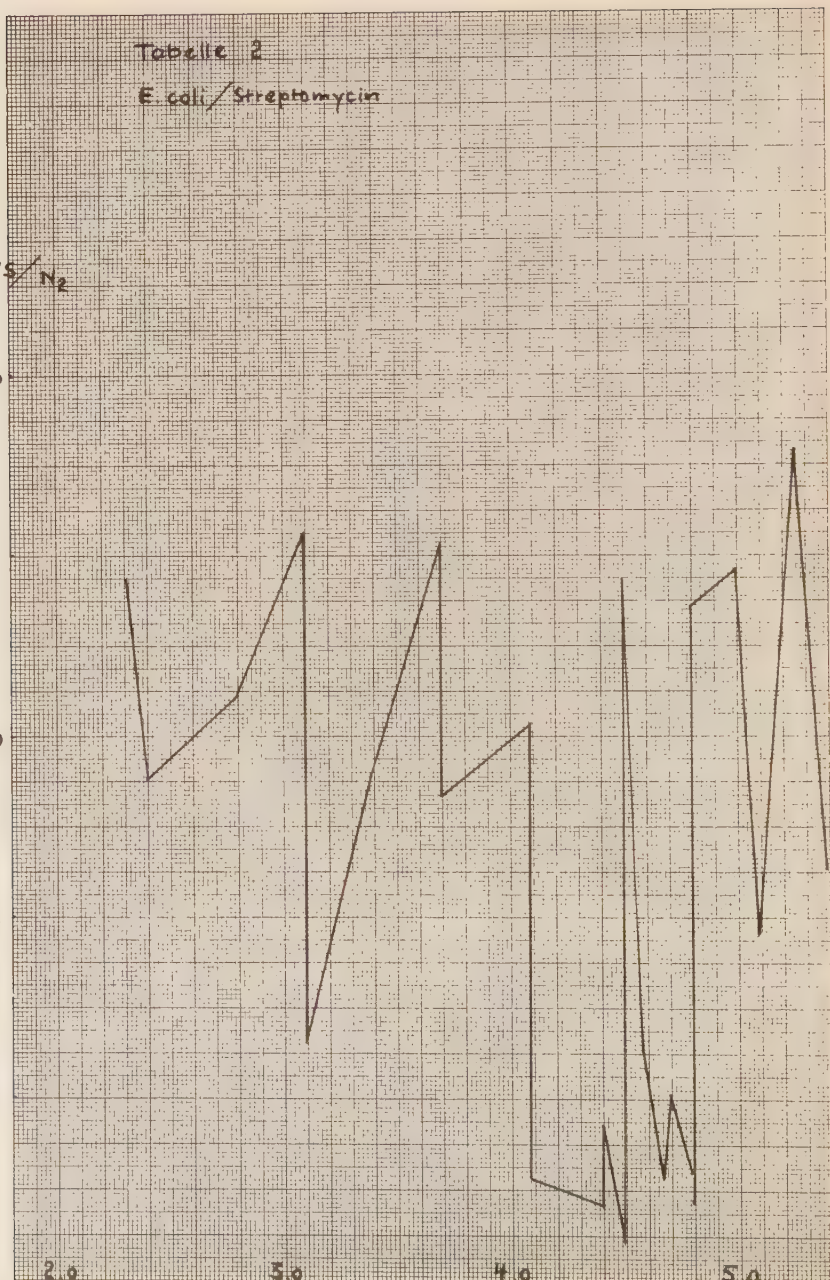
2.0

3.0

4.0

5.0

log. (Resist. $\times 100$)



Bei Coli-Bakterien sind die niedrigsten Werte für DNS/Gesamtstickstoff besonders bei den Stämmen mit hoher Streptomycin-Resistenz zu beobachten. Ferner gewinnt man den Eindruck, daß der Übergang von den hohen Relationswerten für DNS/Gesamtstickstoff zu den kleineren Relationswerten nicht fließend, sondern eher stufenförmig ist. Diese Art der Beziehungen könnte durchaus der Vorstellung über die Art des Resistenzanstiegs von Coli-Bakterien gegen Streptomycin entsprechen.

Die statistische Berechnung der Regression ergibt mit $x = 10 \text{ g}$ (mittl. Streptomycin-Sensibilität $\cdot 100$) und $y = \text{DNS/Gesamtstickstoff}$ bei $n = 29$ für $S_x^2 = 9,1$, für $S_y^2 = 57,4 \cdot 10^6$ und für $S_{xy} = -10120$ ein $b = -1111$. Diese Abnahme von DNS/Gesamtstickstoff mit zunehmender Resistenz ist mit $s_b = 433,5$ und $t = 2,5637$ bei $P = < 0,02$ ($> 0,01$) mit einer Wahrscheinlichkeit von 98% für die Reproduzierbarkeit beweisend.

Um den scheinbar stufenförmigen Abfall der DNS/Stickstoffrelation zu untersuchen, wurden ferner die Mittelwerte dieser Relationen bei den Stämmen aus gleich großen logarithmischen Resistenzbreiten (2,6 - 3,9 und 4,0 - 5,4) verglichen. Die Mittelwerte der Relationen sind für die erstgenannte Resistenzbreite 3013 ± 930 bei $n = 7$ und für die zweitgenannte Resistenzbreite 16338 ± 1441 bei $n = 20$. Die Differenz zwischen diesen beiden Mittelwerten ist mit $b = 2,3419$ und $P = < 0,05$ ($> 0,02$) beweisend, wenn man als Kriterium für die Zufallsbedingtheit der Differenz 5% annimmt. Ein höherer Signifikanzgrad ist kaum zu erwarten, da das erste Kollektiv nur sieben Einzelwerte umfaßt.

6) Diskussion

Nach den beschriebenen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Relation DNS/Gesamtstickstoff mit steigender Penicillin-Resistenz der Stämme zunimmt. Dabei handelt es sich um Stämme, die keine Penicillinase bilden. Umgekehrt wurde festgestellt, daß bei Stämmen von *E. coli* mit zunehmender Streptomycin-Resistenz die Relation DNS/Gesamtstickstoff kleiner wird.

Gegen die beschriebene Art der Versuchsanordnung könnte eingewandt werden, daß das Alter der Keime eine Bedeutung hat für die Relation von Zellstickstoff zum DNS-Gehalt der Zelle. CALDWELL und HINSHELWOOD beobachteten bei *B. lactis aerogenes*, daß der Zellstickstoff bezogen auf die Zellzahl bei gleichbleibendem DNS-Gehalt während des Wachstums zu-

nimmt. Dem entspräche eine kleiner werdende Relation DNS/Gesamtstickstoff. Dieselben Autoren weisen darauf hin, daß gegen Ende des Wachstumszyklus DNS vermehrt gebildet werden soll. In Berücksichtigung dieser aus der Literatur bekannten Beobachtungen wurden für die hier beschriebenen Versuche Keime aus gleichaltrigen Kulturen benutzt. Natürlich sind auch in solchen gleichaltrigen Kulturen nicht alle Einzelzellen gleich alt. Deswegen muß trotz gleichen Kulturalters eine entsprechende Fehlerbreite in Kauf genommen werden.

Auffallend ist ferner der hohe Gehalt an DNS im Verhältnis zum Gesamtstickstoff. Aus den beiden oben wiedergegebenen Abbildungen ist die große Streuung der einzelnen Relationswerte zu ersehen. Alle diese Fehler und Möglichkeiten gehen aber in die statistische Berechnung ein. Da die Abhängigkeit der Relation DNS/Gesamtstickstoff vom mittleren Resistenzgrad regressionsstatistisch gesichert wurde, können diese Fehler für eine prinzipielle Aussage in Kauf genommen werden.

Der prozentuale Fehler bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs wurde für jede einzelne Messung erfaßt. Im wesentlichen ist dieser Fehler bedingt durch die Tropfengröße bei der Titration und weniger durch das Pipettieren der Keimsuspension, weshalb er mit dem Stickstoffwert variiert. Die Titrationsfehler liegen bei der angegebenen Versuchsanordnung im Mittel bei $\pm 4,7\%$. Dieser mittlere Fehler ist nennenswert kleiner als der bei einer - wenn auch recht genauen - Keimzählung. Deswegen wurde der Gehalt an Gesamtstickstoff einer Bezugsgröße für die DNS-Bestimmung gewählt. Da der Gesamtstickstoff pro Volumeneinheit der Keimsuspension quantitativ erfaßt wurde, war dasselbe erforderlich für die Bestimmung des DNS-Gehalts. Für die DNS-Bestimmung waren deswegen alle mechanischen Verfahren zur Aufschließung der Zellen abzulehnen, da solche Verfahren, die eine quantitative Aufschließung aller Zellen einer Keimsuspension gewährleisten, nicht zur Verfügung stehen. Geeignet erwies sich die Methode der DNS-Bestimmung von GLASS und NOVICK. Bei dieser Methode wird zwar die gesamte DNS erfaßt, jedoch sind aber auch alle anderen Zellinhaltsstoffe bei der Messung vorhanden. Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß dadurch die Werte etwas höher liegen, als nach vorhergehender Extraktion der DNS nach mechanischer Zellerstörung (wobei auch mit einem DNS-Verlust zu rechnen wäre). Danach dürfte dadurch das regressionsstatistische Material nicht beeinflußt werden. Darüber hinaus ist die Nachweismethode von RACKER recht spezifisch.

Zum Schluß wären noch die Ergebnisse von BUKRINSKAJA und DEBOW zu diskutieren. Diese Autoren sollen gefunden haben, daß besonders bei jungen

Kulturen und "Kokken" der Gehalt an DNS mit zunehmender Resistenz gegen Penicillin und Streptomycin zunimmt. Bei Coli-Bakterien dagegen soll bei Resistenzerscheinungen gegen die beiden genannten Antibiotika der DNS-Gehalt unverändert bleiben, während der Proteingehalt zunähme. Eine genauere Würdigung dieser Arbeit ist leider nicht möglich, da die Originalarbeit weder durch eine westdeutsche Bibliothek noch durch das Osteuropa-Institut zu erhalten war. Somit kann nicht gesagt werden, welche Methoden verwandt wurden (das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Verfahren der DNS-Bestimmung fußt auf Angaben von 1959 und die Arbeit von BUKRINSKAJA soll 1955 erschienen sein), welche Bezugsgrößen gewählt wurden und ob das Kulturalter zu der Bewertung herangezogen wurde. Nach dem Referat ist es sehr wahrscheinlich, daß die Konzeption dieser Arbeit etwa der von CALDWELL und HINSHELWOOD (1950) entspricht.

7) Zusammenfassung

Mit einer größeren Zahl von nicht penicillinasebildenden penicillinresistenten Staph. aureus-Stämmen und streptomycinresistenten Zellen von E. coli wurde bei gleichaltrigen Kulturen die Relation Desoxyribonukleinsäure zum Gesamtstickstoff der Zellen in Beziehung gesetzt zum mittleren Resistenzgrad jeder Population. Die Versuche ergaben, daß bei sonst gleichen Versuchsbedingungen mit zunehmender Penicillin-Resistenz bei Staphylokokken die Größe für Desoxyribonukleinsäure/Gesamtstickstoff zunimmt im Gegensatz zu streptomycinresistenten Stämmen von E. coli.

LITERATURVERZEICHNIS

- BASS, A. D. und DUNN, C. A. Proc. Soc. exp. Biol. 96, 175 (1957)
- BLAIR, I. E. Bull. N. Y. Acad. Med. 30, 474 (1954)
- BRYSON, V. und DEMEREC, M. Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 283 (1950)
- BRYSON, V. und SZYBALSKI, W. Advanc. Genet. 7, 1 (1955)
- BUKRINSKAJA, A. G. und DEBOW, Ss. Fragen med. Chemie 1, 422-25 (1955)
Moskau, auszugsw. zitiert in "Chem. Zentralblatt" 127, 10039 (1956)
- CALDWELL, P. C. und HINSHELWOOD, T. J. chem. Soc. 1415, 3156 (1950), zit.
Leslie, I. in The nucleic acids. Herausgegeben v. Chargaff, E. u. J. N. Davidson. Acad. Press, New York 1955
- DEMEREC, M. J. Bact. 56, 63 (1948)
- GILLISSEN, G. Experientia 15, 200 (1959)
- GILLISSEN, G. und SCHILLING, A. Ärztl. Forsch. (im Druck)
- GILLISSEN, G. und RUDA, M. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 171, 281 (1958)
- HAIGHT, T. H. und FINLAND, M. Proc. Soc. exp. Biol. 81, 183 (1952) und
81, 188 (1952)
- HUNTER, J. E., MUDD, S. und WOODBURN, M. A. J. Bact. 60, 315 (1950)
- MAYER-HARTING, A. J. gen. Microbiol. 13, 9 (1955)
- MEISSNER, G. Beitr. Klin. Tuberk. 110, 219 (1953)
- MURRAY, R., KILHAM, L., WILCOX, X. u. FINLAND, M. Proc. Soc. exp. Biol. 63, 470 (1946)
- RACKER, E. J. biol. Chem. 196, 347 (1952)
- RAKE, G., McKEE, C. M., HAMRE, D. M. u. HENCK, C. L. J. Immunol. 48, 271 (1944)
- SCHNITZER, R. Ergebnisse Hyg. Bakt. 13, 227 (1932)

- SMOLENS, J. und VOGT, A. B. J. Bact. 66, 140 (1953)
- SZYBALSKI, W. Antibiot. and Chemother. 3, 1095 (1953)
- SZYBALSKI, W. und BRYSON, V. J. Bact. 64, 489 (1952)
- VENDRELY, R. und VENDRELY, C. Experientia 4, 434 (1948)
- WILDE, J. Z. ges. inn. Med. 13/14, 519 (1958)
- WRIGHT, S. S. und FINLAND, M. Proc. Soc. exp. Biol. 85, 40 (1954)

Mein besonders herzlicher Dank gilt an dieser Stelle Herrn
Professor Dr. med. Dr. rer. nat. G. Gillissen für die Über-
lassung des Themas und die vorbildliche Anleitung zur wissen-
schaftlichen Arbeit.

LEBENS LAUF

Ich heiße Eberhard Kauer und wurde als Beamtensohn am 10.12.1927 in Dresden geboren. Nach vierjährigem Besuch der 39. Volksschule von 1934 bis 1938 ermöglichten mir meine Eltern den Wechsel zur Staatlichen Oberschule Dresden-Plauen. Leider wurde meine schulische Ausbildung schon als Sechzehnjhriger infolge der Verwendung als Luftwaffenhelfer, einige Monate später zwecks Ableistung der Arbeitsdienstpflicht und schließlich im Herbst 1944 durch die Einberufung zur ehemaligen Luftwaffe abgebrochen.

Im Spätsommer 1948 kehrte ich aus amerikanischer und französischer Kriegsgefangenschaft zu meinem Elternhaus nach Dresden zurück.

Meine Bemühungen, das Abitur nachzuholen, fruchteten erst Ende 1950 mit der Zulassung zum Besuch der Abendoberschule Dresden, während ich tagsüber die Tätigkeit eines Kulturreferenten, eines freien Mitarbeiters einiger Zeitungen und schließlich die eines Redakteurs ausübte.

Im Sommer 1952 legte ich das Abitur ab und immatrikulierte im WS 1952/53 an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Aber schon nach Weihnachten 1953 zog ich es vor, mich beginnender politischer Willkür zu entziehen und verließ die sog. DDR. In der Bundesrepublik arbeitete ich bei einem Verlag als Vertreter, um eine finanzielle Grundlage für die Fortführung des Studiums zu schaffen.

Im SS 1955 wurde ich zwar zum weiteren Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt zugelassen, aber mit der Auflage, eine Ergänzungsprüfung zum Ostzonenabitur binnen zwei Semestern abzulegen. Diese Tatsache behinderte erheblich mein Vorwärtskommen, so daß meine damalige Verlobte und jetzige Frau ebenfalls die Ostzone verließ, um mich wirtschaftlich und nicht zuletzt ideell zu unterstützen.

Im WS 1956/57 wechselte ich zur Johannes Gutenberg-Universität Mainz über. Dort legte ich nach dem SS 1957 das Physikum ab. Am 21.11.1961 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

